

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-205402

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)9月6日

C 08 B 37/00
A 61 K 31/725Q
ADU
AED7624-4C
7431-4C

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全7頁)

⑮ 発明の名称 リグニン配糖体およびその用途

⑯ 特 願 平2-113048

⑰ 出 願 平2(1990)4月28日

優先権主張 ⑱ 平1(1989)10月28日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 平1-280398

㉑ 発 明 者 田 沼 靖 一 東京都八王子市小門町1-10

㉒ 出 願 人 株式会社ミドリ十字 大阪府大阪市中央区今橋1丁目3番3号

㉓ 代 理 人 弁理士 高 島 一

明 細 書

1. 発明の名称

リグニン配糖体およびその用途

2. 特許請求の範囲

(i) 以下の性質を有するリグニン配糖体。

(i) リグニンおよび多糖類が結合

(ii) 分子量は60000~140000

(iii) リグニンと多糖類の結合比は1:1~20
:1(分子比)(iv) 多糖類はウロン酸60~70%、中性糖30
~40%で構成されている。(2) リグニン配糖体を主成分とするポリ(ADP
-リボース)グリコヒドラーゼ阻害剤。(3) リグニン配糖体を主成分とするサイトカイン
作用の増強剤。(4) リグニン配糖体を主成分とするサイトカイン
産生の誘発剤。

(5) リグニン配糖体を主成分とする癌免疫療法剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は新規なリグニン配糖体およびその用途
に関する。

〔従来技術・発明が解決しようとする課題〕

現有の抗癌剤の殆どは、DNA合成あるいは細胞分裂を抑制する作用を持つが、これは正常細胞に対しても同等な作用を示す。わずかに癌細胞は細胞分裂が速く、正常細胞は遅いと言う差を利用して、癌細胞に、より多くの障害を与えることで治療が成り立っている。正常細胞が受けた障害は、副作用として表現され、生体はその副作用にどこまで耐えられるかが、癌治療上で重要なポイントとなっている。

以上の様に、本来の癌治療は癌細胞の生物学、生化学などに根ざすべきものであるが、現実にはその様な癌治療法にまで結びついていない。

さて、癌の原因と言うと発癌物質、放射線およびウイルスの3つが古くより言われてきた。その内、癌ウイルスの持つ遺伝情報により細胞が癌化することが明らかになり、oncogene(癌遺伝子)なる言葉が生まれた。その後、癌遺伝子は正常細胞

癌にも存在し、それがあつた時スイッチオンされて、細胞が悪化すると言う仮説が立てられたのである。これは、時の流れと共に発展し、今日その大筋は正しかったことを誰しも認めるところである。

一方、高等動物のゲノムには癌遺伝子となり得る proto-oncogene は 50 種以上存在し、それらは正常細胞の増殖や分化に重要な生理機能を果たしている。それ故、細胞増殖や癌の制御の遺伝子のレベルもしくは遺伝子産物のレベルでのコントロールの可能性が生まれて来た。本発明は癌遺伝子発現の段階を、特異的阻害剤で抑制する癌治療剤を開発することにある。挿入されたマウス乳癌ウイルス (MMTV) 遺伝子の発現がコルチコイドにより制御されているマウス乳癌細胞を用い、MMTV 遺伝子発現にはクロマチンタンパク質での脱ポリ ADP-リボース反応が引き金となっていることが見出されている。即ち、ポリ ADP-リボースが分解されることにより、その部分のクロマチン構造の局所変化が、最終的には RNA ポリメラーゼのプロモーターへの結合と転写促進につながると考

えられている。(ジャーナル・バイオロジカル・ケミストリー、258:15371(1983))。

そこで、発明者はポリ ADP-リボースの分解を阻止すれば、癌遺伝子が活性化されなくなることが予想されたため、ADP-リボースの分解に関与する酵素であるポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼをヒト胎盤より分離精製し、本酵素に対し阻害作用をもつ化合物を検討した結果、幾つかの天然化合物に強い阻害活性を見出した。

また、この化合物には腫瘍壊死因子 (TNF) のもつ細胞殺傷作用と細胞分化誘導作用を増強する全く新しい活性があることを見出し、この増強効果が TNF 受容体への TNF の結合親和性を高めることに起因することも突き止めた。さらに、この化合物にはマクロファージからの TNF、インターロイキン 1 の産生を誘導する作用があることを見出した。そして、さらに検討を進め、ポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼ阻害、及び TNF をはじめとするサイトカインの誘導およびそれらの作用増強効果に基づく抗癌作用を有

する医薬として、使用に耐え得る新規化合物を見出し、本発明を完成した。

(課題を解決するための手段)

即ち、本発明は次の要旨を有するものである。

- ① 以下に示す性質を有するリグニン配糖体
 - (i) リグニンおよび多糖類が結合
 - (ii) 分子量は 60000 ~ 140000
 - (iii) リグニンと多糖類の結合比は 1:1 ~ 20:1 (分子比)
 - (iv) 多糖類はウロン酸 60 ~ 70%、中性糖 30 ~ 40% で構成されている。
 - ② リグニン配糖体を主成分とするポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼ阻害剤。
 - ③ リグニン配糖体を主成分とするサイトカイン、すなわち腫瘍壊死因子 (TNF) 作用増強剤。
 - ④ リグニン配糖体を主成分とするサイトカイン (TNF, IL-1) の産生誘導剤。
 - ⑤ リグニン配糖体を主成分とする (TNF などのサイトカインとの併用による) 癌免疫療法剤。
- 本発明のリグニン配糖体は、リグニンと糖 (多

糖類) との結合体である。リグニンと糖 (多糖類) との結合はエーテル結合による。その結合比は、リグニン:構成糖の重量比で 1:3 ~ 5 程度が例示される。また、リグニンと多糖類との分子比で 1 ~ 20:1 程度が例示される。

リグニン配糖体の糖部分はウロン酸および中性糖より構成される。その組成としてはウロン酸 60 ~ 70%、中性糖 30 ~ 40% 程度が例示される。

中性糖としては、グルコース、ガラクトース、マンノース、アラビノースが挙げられる。その組成としてはグルコース 15 ~ 20 mol%、ガラクトース 25 ~ 30 mol%、マンノース 35 ~ 50 mol%、アラビノース 10 ~ 15 mol% 程度が例示される。

これらの構成糖は全体として糖鎖構造を取っており、多糖類を形成する。

リグニン配糖体の分子量は 80000 ~ 140000 程度であり、多糖類部分の分子量は 4 万 ~ 10 万程度である。またリグニン部分は分子量 1000 ~ 10000 程度を有する。

本発明リグニン配糖体は、元素的にはC原子35～45重量%、H原子1～10重量%、O原子45～64重量%程度が例示される。

本発明のリグニン配糖体は以下のように調製される。

出発原料としては茶(葉・枝)、紫根、三豆根、朝鮮人参、松(かさ・葉)、草みづき(幹)等が挙げられる。

原料を各種溶媒(例えば、熱水、エタノール、アセトン等)で処理する。処理時間は1～15時間程度である。処理済み原料をアルカリ性溶液(0.1～1N水酸化ナトリウム、アンモニウム等)で抽出する。抽出液をpH4～6に調整し、1～5倍量のエタノールを添加して沈澱画分を回収する。沈澱画分をゲル通過で精製して活性部分を回収する。

こうして得られたリグニン配糖体は透析、遠心分離、凍結乾燥等を施すことができる。

本発明のリグニン配糖体は、ポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ阻害作用、及びTNF

Fの産生誘導およびその作用の増強効果を有し、ヒトを含む哺乳動物(ヒト、ウマ、イヌ、マウス、モルモット、ラット等)に対してポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ阻害活性、及びTNFの産生誘導およびその作用の増強活性を有し、ポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ阻害剤、及びTNFの産生誘導およびその作用増強活性剤として悪性腫瘍、ウイルス性感染症の治療、予防に有用なものである。

本発明のリグニン配糖体は、経口的または非経口的に投与される。

リグニン配糖体は、それ自体または製薬上許容されるキャリアとの医薬製剤の形で投与される。当該製剤は、自体既知の方法によって調製される。剤型としては、錠剤、カプセル剤、散剤、坐剤、注射剤等が例示される。

リグニン配糖体は、例えば、経口投与の場合、通常0.1～100mg/kg体重程度を1日1回または数回にわたって投与されるが、年齢、体重、および/または処置すべき病状の重症度や治療に対す

7

る反応によりその投与量は変わりうる。

毒性実験

本発明のリグニン配糖体のマウスに対する毒性は、いずれも経口投与でLD₅₀値が100mg/kg以上であり、投与量にくらべてLD₅₀値が極めて大きく、安全域の広い化合物である。

(実施例)

実施例1

以下の処理に付すことによってリグニン配糖体を抽出した。

例

松かさ

熱水抽出 煮沸時間は松かさの量、また水の量により異なるが通常2時間×3回行う。

エタノール抽出 熱水抽出した松かさを半乾燥状態のままエタノールに浸し一昼夜室温に置く。

アセトン抽出 エタノール抽出した松かさを

8

半乾燥状態のままアセトンに浸し一昼夜室温に置く。

0.3N水酸化ナトリウム(又はアンモニア)溶液抽出

アセトン抽出した松かさをランプにて乾燥させ、0.3N水酸化ナトリウム溶液にて長時間(又は一昼夜)浸漬しながら抽出する。この抽出液に酢酸を加えてpHを5.0に調す。沈澱物は高速遠心により除去する。

エタノール沈殿 抽出液に等量のエタノールを加え低温室で一晩静置。沈澱物を高速遠心により回収する。沈澱物を水に溶かし、透析して透析する。

9

1. 凍結乾燥

透析後の溶液を凍結乾燥にて粉末にする。

2. ゲル濾過

凍結乾燥粉末をセファロース (Sephacrose) CL-4B にて精製する (移動層は 0.1 N NaOH)。活性フラクシオンを集め、酢酸を加えて pH を 5.0 に戻した後、1 倍量のエタノールを加えて水中に 1~2 時間置き、沈殿を高遠心より採集する。沈殿物を 10% エタノールに溶かし、トヨパール HW-40F にてさらに精製する (移動層は 10% エタノール)。活性フラクシオンを集め、水に対して透析した後、凍結乾燥により粉末にする。

実施例 2

中性糖としてはグルコース、ガラクトース、マンノース、アラビノースを含むがフコースは含まない。

a) ウロン酸はカルバゾール法、中性糖はフェノール硫酸法で定量した。

b) 中性糖の組成はメタノリシスで生成するメチルグリコシドをトリメチル化した後ガスクロマトグラフィーで分析した。

〔アグリコンの分析〕

分子量：セファロース (Sephacrose) CL-6B ゲル濾過法により 4000 ± 2000

赤外吸収分析 (IR)

IR は KBr ディスクにより測定した。

その結果、 $3500 \sim 3700 \text{ cm}^{-1}$ 範囲に 3400 cm^{-1} にピークをもつ吸収が検出された。この吸収はフェノール性水酸基の存在を示す。 1600 cm^{-1} 付近の吸収は芳香族二重結合を示す。 1700 cm^{-1} 付近にカルボニル基の吸収がないことよりタンニンに見られるようなエステル結合はなく、リグニンに見られるようなエーテル結合で重合している

リグニン配糖体の糖部分、グリコン (glycone) 及び非糖部分、アグリコン (aglycone) の構造の特徴を検討するために、本配糖体をメタノリシス

(メタノール-塩酸分解)、あるいは亜塩素酸塩 (NaClO_2) 法によりグリコンとアグリコンに分離して分析を行った。その結果は次の通りである。

〔グリコンの分析〕

分子量：セファロース (Sephacrose) CL-4B ゲル濾過法により $50000 \sim 100000$

糖組成 (%) (全重量%)

ウロン酸 53.4 48.8

中性糖 36.6 28.2

グリコンの 2/3 がウロン酸であるという特徴を持つ。

中性糖の組成 (mol %)

グルコース 18.2

ガラクトース 27.4

マンノース 40.2

アラビノース 13.8

フコース 0

化合物であることを示す。

指紋領域も含めて全体のスペクトラムはリグニン (アルカリ) と極めて類似している。

以上の IR スペクトルの結果から本配糖体のアグリコンはタンニン様化合物ではなく、リグニン様化合物であると結論される。

紫外吸収 (UV) 分析

280 nm に最大吸収値、 260 nm に最小吸収値をもつ。

$$280/260 = 1.02$$

リグニンも同様の UV スペクトルをもつ

$$280/260 = 1.03$$

UV スペクトルにより芳香族 (おそらくフェノール) の存在を示す。

電子スピン共鳴 (ESR) 分析

リグニンと同様に $g = 2.004$ ESR シグナルが検出されることより安定なフリーラジカルを有する構造体を含むことを示す。なお、タンニンにはこの様なシグナルは見られない。

〔リグニン配糖体の分析〕

リグニン配糖体全体としての特徴

元素分析	(weight%)
C	39.83
H	4.41
O	53.73
N	0.03以下
S	0

窒素、硫黄を含有しないことより蛋白、硫酸基を含まずセファロース (Sephacrose) CL-4B ゲル濾過法による分子量は約11万である。

リグニンと糖の結合比は重量比で約1:4である。

従って本配糖体は、糖部分(グリコン)としてウロン酸を全重量の約50%も含有するという特徴をもっている。中性糖としてはグルコース、ガラクトース、マンノース、アラビノースを含む。非糖部分(アグリコン)はリグニンより成るという特徴を有する。

本配糖体は糖の還元末端ラクトール水酸基がリグニンのアルコール性またはフェノール性水酸基

と脱水縮合してエーテル状に結合したO-配糖体である。また、リグニンと糖の結合比が重量比で約1:4であり、特に、酸性糖のウロン酸を多く含有する、分子量約11万のリグニン配糖体(アグリコンの特徴で分類した場合)である。

本配糖体の推定構造モデルは図面に示す通りである。

試験例1.

ポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼに対する阻害効果

アッセイ用バッファー(0.01%ウシ血清アルブミン-10mMメルカプトエタノール-50mMカリウム・リン酸、pH7.0)に、 ^3H -(ADP-リボース) $100\mu\text{Ci}$ を加え、その27 μl に被験物質およびヒト胎盤より調製した核由来、ポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ溶液を加えて全量30 μl とした後、37℃にて1時間インキュベーションした。その後、DE81濾紙に反応液を吸収させ、水、エタノール、アセトンで濾紙を洗浄した後、それを乾燥させ、液体シンチレ

15

ーションカウンターにて、未反応基質 ^3H -(ADP-リボース)を測定し、本酵素に対する試験物質の阻害作用を検討した。その結果を示したのが表1であり、用いた被験物質の全てが、用量依存的にポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼを阻害した。

表1

リグニン配糖体のポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ阻害活性

リグニン配糖体濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ポリ(ADP-リボース) グリコヒドロラーゼ活性(%)
0	100
1	83
3	48
10	17
30	8

試験例2

16

遺伝子発現に対する阻害効果

本試験で用いた遺伝子発現系は、腫瘍コルチコイド感受性遺伝子である、マウス乳癌ウイルス(MMTV)遺伝子を持つ、マウス乳癌細胞である341株を使用した。本細胞は、腫瘍コルチコイド存在下において、35S RNAと、さらにスプライシングを受けた24S RNAの2種類を発現する。この発現は env 部分の cDNA を用いることにより検出することが出来る。そこで、341株に被験物質を30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となる様に加え、37℃、30分間インキュベーションし、次に、その系に10 ^{-6}M となる様にデキサメタゾンを添加し、さらに1時間インキュベーションした。その後、341細胞を集め、高分子RNAをグアニジン-塩酸法で抽出、60℃で5分間処理(20mMOPS, pH7.0, 5mM 酢酸ナトリウム, 1mMEDTA)後、1.2%アガロース・ゲル(同バッファー)にて、電気泳動(40V, 16h)を行った。その後、ニトロセルロースへトランスファーし、 ^{32}P -MMTV cDNA(envに特異的なcDNA)をハイブリダイズし、

17

—11—

18

X線フィルムによるオートラジオグラムを作成した。その後、オートラジオグラムより35Sおよび24S RNAのバンドの濃度をデンストメーターで測定することにより、RNA発現量を測定し、被験物質の無添加の場合と比較して、RNA発現抑制割合を算出した。その結果を示したのが表2であり、用いた被験物質はMMTV遺伝子発現抑制作用を示した。

表2

リグニン配糖体の乳癌ウイルス(MMTV)遺伝子発現に対する作用

	デキサメタゾン (1.0 ⁻⁷ M)	リグニン配糖体 (30 μ g/ml)	35S、24S バンドの感光度
1	+	-	++++
2	-	+	+
3	-	-	+
4	+	+	++

19

リグニン配糖体は移植日翌日から4日間連続投与した。

試験例4.

マウス線維芽細胞L-929に対するTNF作用の増強効果

TNFのもつ細胞殺傷作用はL-929細胞のシャーレへの接着性を利用し、生き残った生細胞を染色してその染色濃度を測定することにより測定することができる。そこでL-929細胞に被験物質を加え、次にアクチノマイシンDを4 μ g/mlになる様に添加し、さらにTNFを加え、37℃で、18時間インキュベーションする。その後、プレートを生埋食塩水で洗い死細胞を除去する。その後、生細胞を0.1%クリスタルバイオレットで染色し、染色された生細胞を0.5%SDSにより溶解し、その色素濃度をOD 590 nmで測定し、TNF作用に対する増強効果を検討した。その結果を示したものが表4であり、用いた被験物質の全てが、用量依存的にTNFの細胞殺傷作用を増強した。

21

1は陽性対照、2、3は陰性対照、4は実験群
試験例3.

マウス実験腫瘍に対する抑制効果

マウスの腹腔内に、ザルコーマ180腫瘍細胞を 1×10^6 個移植し、移植後1~4日間被験物質を腹腔内に連続投与した。抗腫瘍活性は、生理食塩液投与群との比較による生存率より求めた。腫瘍移植後45日目にて実験終了とした。その結果を示したのが表3であり、用いた被験物質は抑制作用を示した。

表3

マウス腫瘍ザルコーマ180に対する
リグニン配糖体の抑制作用

試料	Dose (mg/kg)	T/C (%)
ナシ		100
リグニン配糖体	40 \times 4	108
	20 \times 4	206
	10 \times 4	120
	5 \times 4	91

20

表4

マウス線維芽細胞L-929に対するTNF作用の増強効果

リグニン配糖体濃度 (μ g/ml)	TNFのC.O.D.濃度 (μ g/ml)	増強倍率 (%)
0	0.0001	100
3	0.0001	221
10	0.0001	548
30	0.0001	773
100	0.0001	458

試験例5

マウス実験腫瘍に対するTNF・被験物質による抑制効果

マウスの皮下にザルコーマ180腫瘍細胞を 1×10^6 個移植し、移植後1~4日間被験物質およびTNFを連続投与した。抗腫瘍活性は生理食塩液投与群との比較による生存率より求めた。腫瘍移植後、45日目にて実験終了とした。その

22

結果を示したのが表5であり、用いた被験物質は
TNFとの併用により強い制癌作用を示した。

表 5

マウス腫瘍ザルコーマ180に対するリグニン
配糖体とTNFの併用による効果

試料	濃度 (mg/kg)	T/C (%)
0		100
TNF		118
TNF+	40×4	191
リグニン配糖体	20×4	298
	10×4	254
	5×4	188

リグニン配糖体はTNFとともに移植日翌日か
ら4日間連日投与した。

4. 図面の簡単な説明

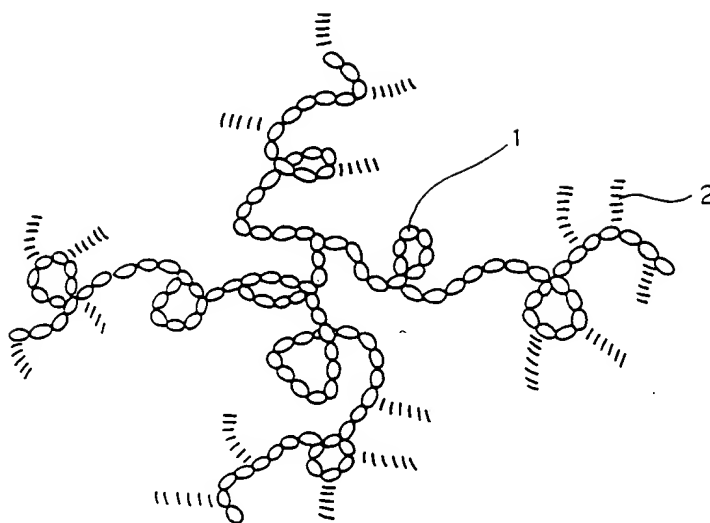
図面は本発明リグニン配糖体の推定構造を示す。

1: 糖

2: リグニン

特出願人 株式会社 ミドリ十字

代理人 弁理士 高 島 一



CAplus Answer Number 9 - 1998 ACS

Title

Lignin glycosides for inhibition of poly(ADP-ribose) glycohydrolase and tumor

Inventor Name

Tanuma, Yasukazu

Patent Assignee

Green Cross Corp., Japan

Publication Source

Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 7 pp.

CODEN

JKXXAF

Patent Information

JP 03205402 A2 910906 Heisei

Application Information

JP 90-113048 900428

Priority Application Information

JP 89-280398 891028

Abstract

The title lignin glycosides extd. from natural products, such as pine cones, tea leaves, and ginseng roots, have a mol. wt. of 60,000-140,000 Da, and the mol. ratio of lignin to a saccharide 1-20:1, and the saccharides comprising uronic acid 60-70 % and neutral sugars 30-40%. The lignin glycosides inhibit poly(ADP-ribose)glycohydrolase and enhance the activity of cytokines and are also effective in immunotherapy.

International Patent Classification

International Patent Classification, Main

C08B037-00

International Patent Classification, Secondary

A61K031-725

Document Type

Patent

Language

Japanese

Accession Number

1991:687171

Reference Number

115:287171

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)